Sur une méthode d'analyse des organismes végétaux du plancton;

PAR M. L. MANGIN.

Les organismes qui constituent le phytoplancton sont des Algues de petite taille appartenant surtout aux Diatomées et aux Péridiniens. J'ai établi que ces deux groupes d'Algues, qui possèdent en commun le caractère de présenter une cuirasse rigide protégeant le corps protoplasmique, diffèrent profondément l'un de l'autre par la nature de la membrane et diffèrent en même temps des autres plantes.

Chez les Péridiniens, la membrane est constituée par la cellulose presque pure, à l'exclusion presque complète des composés pectiques; chez les Diatomées c'est l'inverse qui a lieu, la partie organique de la membrane étant formée de composés pectiques sans trace de cellulose. La connaissance de la constitution chimique de la membrane chez ces plantes permet de déterminer les colorants les plus actifs capables de mettre en évidence les plus menus détails de la structure. J'ai depuis longtemps montré que, pour la cellulose, les colorants acides complètent les observations faites au moyen des réactifs iodés; tandis que pour les composés pectiques, l'emploi des colorants basiques est tout indiqué. C'est surtout dans l'analyse qualitative et quantitative du plancton que ces réactifs rendent des services en permettant un examen rapide, précis et complet.

Je me propose dans cette communication d'indiquer brièvement la méthode à suivre pour obtenir ce résultat.

La différence de constitution des membranes ne permet pas de faire l'observation simultanée des deux groupes d'Algues; quand les Diatomées sont colorées, les Péridiniens demeurent incolores et inversement. Il faut donc deux séries d'observations pour une analyse complète.

Péridiniens. — En ce qui concerne les Péridiniens on peut employer indifféremment les réactifs iodés ou les couleurs de benzidine.

Le réactif iodé qui fournit des résultats toujours très nets et instantanément est *l'acide iodhydrique iodé fumant*[1].

Le sédiment de plancton, précipité par l'alcool ou par les agents fixateurs et conservé dans l'alcool, est déposé sur une plaque de verre et, lorsqu'il est à peu près desséché, on ajoute sur la lamelle une goutte d'acide iodhydrique iodé fumant, puis on enlève l'excès de réactif et on ajoute 1 ou 2 gouttes de chloral glycériné[2]. On a ainsi un liquide jaunâtre qui, à cause de sa forte réfringence, masque toutes les Diatomées, par contre, les Péridiniens les plus délicats sont colorés en brun violacé; la coloration persiste pendant quelques semaines ou quelques mois.

On peut compléter cet examen en employant les colorants acides, notamment l'azobleu, l'azoviolet ou l'azurine brillante, qui fournissent des colorations doubles très jolies et, ce qui ne gâte rien, très instructives, car le protoplasme prend une teinte différente de celle de la membrane.

Voici comment on procède : on place le sédiment à examiner dans un tube à essai contenant 5 ou 10 cm^3 d'eau additionnée d'une ou deux pastilles de potasse caustique de la grosseur d'une forte lentille, on y ajoute une certaine quantité de matière colorante, du volume d'un grain de chènevis. On fait bouillir pendant quelques minutes, on laisse refroidir dans le liquide colorant et on lave par sédimentation ou par centrifugation.

Si l'on a employé l'azurine brillante, la membrane des Péridiniens est colorée en bleu de ciel, et les masses plasmiques, plus ou moins désorganisées, sont colorées en violet lie de vin. Les préparations sont conservées dans la glycérine aqueuse; comme elles se décolorent assez rapidement, on peut les conserver plus longtemps en additionnant l'eau de lavage de sulfate de cuivre à 0,5 p. 100, mais dans ce cas, les doubles colorations ne sont plus aussi nettes.

On peut réaliser ces colorations aussi bien avec le plancton tué par l'alcool ou avec celui qui a été fixé à l'acide chromique[3].

1. On le prépare en achetant de l'acide iodhydrique fumant; lorsqu'il est récemment préparé, il est incolore, on y ajoute alors un cristal d'iode; s'il est déjà un peu ancien, il renferme naturellement de l'iode dissous.

2. Préparé en dissolvant jusqu'à saturation du chloral hydraté dans un mélange de glycérine et d'eau à parties égales.

3. Eau 100, acide chromique 0,5, acide acétique 3 cc.

D'autres colorants peuvent être utilisés : le congo brillant, la benzoazurine, la delta purpurine, etc. On choisira celui qui convient le mieux suivant le résultat qu'on veut obtenir : ainsi le congo brillant, la benzopurpurine, qui teignent les Péridiniens en rouge dans un milieu alcalin, pourront être utilisés pour obtenir des photographies microscopiques. Mais on ne pourra pas conserver les préparations à l'aide du sulfate de cuivre, car la teinte rouge vire au bleu.

Les Péridiniens présentent fréquemment des kystes qui apparaissent à la fin de la période de végétation ; j'ai montré que la membrane épaisse et entièrement lisse de ces kystes renferme, notamment chez le *Ceratium cornutum*, un mélange des 3 substances fondamentales de la membrane : cellulose, composés pectiques et callose.

Il est important de pouvoir mettre en évidence la présence de ces kystes parce que, là où ils existent, les espèces appartiendront au plancton néritique.

Voici comment on peut procéder. La récolte à examiner est placée dans l'eau additionnée de potasse caustique et d'un mélange de rosazurine G et d'azurine brillante; le mélange est soumis à l'ébullition, puis, après refroidissement, lavé et traité, *le lavage étant complet*, par du sulfate de cuivre à 0,5 p. 100. La carapace des Péridiniens est colorée en bleu, tandis que la paroi plus ou moins épaisse du kyste est colorée en rose ou en rouge. Les préparations obtenues par ces procédés ne peuvent pas être montées au baume, parce que les colorants se dissolvent dans l'alcool.

Diatomées. — La coloration des Diatomées ne peut pas être réalisée dans les mêmes milieux que celle des Péridiniens, à cause de la différence fondamentale de constitution de la membrane. Toutes les matières colorantes basiques peuvent être employées dans ce but. On sait que la safranine, et le bleu de méthylène ont déjà été utilisés dans ce but par un certain nombre d'auteurs. Pour les Diatomées à l'état frais ou renfermées dans un plancton coagulé par l'alcool, l'hématoxyline alunée vieille donne les meilleurs résultats, notamment l'hématoxyline à l'alun d'ammoniaque, de rubidium, de potassium, pourvu que

ces liquides colorants aient au moins six mois de préparation.

Voici comment on procède. Le plancton, récolté et conservé dans l'alcool séjourne 24 heures dans l'hématoxyline alunée vieille; au bout de ce temps, on lave par décantation ou par centrifugation et on monte les préparations dans la glycérine aqueuse. Si l'on veut obtenir des préparations durables, on déshydrate par l'alcool et on monte dans l'essence de girofle et dans le baume de Canada.

Lorsque l'on a employé le plancton brut, coagulé par l'alcool, il est presque toujours mélangé à des matières mucilagineuses qui ont été coagulées en entraînant les particules organiques en suspension dans l'eau; les préparations sont alors mélangées à ces masses gélatineuses et à ces particules organiques agglutinées sur les Diatomées et offrant la plus grande ressemblance avec des masses plasmiques. Ce sont sans doute ces dépôts que Schütt a pris pour du protoplasme extramembraneux dans les rares exemples où il a prétendu le mettre en évidence, et dont il s'est servi pour étayer sa théorie ingénieuse de l'accroissement centrifuge.

En tout cas, ces dépôts gênent souvent l'observation. Il est alors nécessaire de laver le plancton brut coagulé par l'alcool en décantant à plusieurs reprises; l'eau de lavage est additionnée de thymol ou d'acide phénique pour éviter le développement d'organismes. On procède alors à la coloration comme il est indiqué plus haut.

Les matériaux fixés par les réactifs à l'acide chromique ne peuvent être employés, car la membrane demeure incolore même après un long séjour dans le réactif colorant. Les solutions d'hématoxyline alunée sont préparées d'après la formule de Delafield, mais la quantité d'alun peut varier sans inconvénient du simple au double. A l'exception de l'alun de chrome et de l'alun de fer qui ne conviennent pas pour ces colorations, tous les autres aluns peuvent être employés, pourvu que la solution soit vieille. On peut renforcer considérablement la teinte des valves de Diatomées en laissant macérer les organismes du plancton pendant 24 heures dans le vanadate d'ammonium à 1 p. 100, mais il ne faut pas ajouter l'hématoxyline avant d'avoir fait subir au sédiment un lavage complet.

Les préparations ainsi obtenues, d'une observation facile, se prêtent très bien à l'obtention de microphotographies.

Le procédé opératoire que je viens d'indiquer paraîtra peut-être un peu long; mais il fournit des résultats d'une si grande netteté qu'on ne peut plus s'en passer dès qu'on l'a essayé.